

Non-invasive fetal RhD genotyping – economic impact on antenatal Rh isoimmunization prophylaxis

Genotipagem RhD fetal não invasiva – impacto económico na profilaxia da isoimunização RhD na gravidez

Alexandra Miranda*, Marta Ferreira**, Luís Castro***, Alexandra Cadilhe****, Domingos Jardim da Pena*****
Hospital de Braga

Abstract

Overview and Aims: The introduction of antenatal RhD isoimmunization prophylaxis was of utmost importance in decreasing the prevalence of perinatal haemolytic disease. Noninvasive genotyping of fetal RhD group from mothers' plasma allows administration of anti-D immunoglobulin only to pregnant women with RhD positive fetuses.

Aim: To analyse the economic impact of this technique in a population of nonisoimmunized pregnant women in comparison to the current practice of systematic RhD isoimmunization prophylaxis.

Study design: Retrospective, observational and analytic study.

Population: 9272 pregnant women who performed obstetric ultrasound in our Fetal Medicine and Prenatal Diagnosis Department between January 2007 to December 2012.

Methods: The costs of systematic RhD isoimmunization prophylaxis were compared to fetal RhD genotyping and further RhD isoimmunization of RhD negative mothers whose fetuses were RhD positive.

Results: In the studied population, 16.7% of pregnant women were RhD negative and 40.3% of their offspring were also RhD negative. Concerning the economic analysis, selective administration of anti-D immunoglobulin based on fetal genotyping would have been about 62 euros more expensive per pregnancy than the current practice of antenatal immunoprophylaxis.

Conclusion: Although non-invasive genotyping of fetal RhD group is undoubtedly associated with innumerable benefits, in a merely economic analysis, this method is more expensive than the systematic immunoprophylaxis.

Keywords: Non-invasive fetal RhD genotyping - Economic impact on antenatal Rh isoimmunization prophylaxis.

INTRODUÇÃO

A Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) consiste no aparecimento de anemia hemolítica no feto ou recém-nascido (RN), hidrúpsia fetal e, em última instância, morte *in utero*, decorrentes do desenvolvi-

mento materno de imunoglobulinas contra antígenos de eritrócitos fetais¹⁻⁶.

Durante a gravidez e parto pode haver passagem de eritrócitos fetais para a circulação materna^{7,8} sendo que, em algumas situações, os eritrócitos fetais são portadores de antígenos de superfície diferentes dos maternos. O tecido que separa os vasos placentares do espaço intervilloso vai diminuindo de espessura ao longo da gravidez, permitindo que as trocas de sangue entre mãe e feto vão aumentando até ao termo da gestação, culminando no parto⁹.

A incompatibilidade materno-fetal do antígeno D, um dos 50 antígenos do grupo sanguíneo Rhesus com expressão nos eritrócitos fetais a partir da 6ª semana de gestação^{9,10}, continua a ser a causa mais importante de DHPN severa¹¹. Menos comumente, as causas de

*Interna de Formação Específica de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Braga, Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Minho

**Aluna do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina da Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Minho

***Assistente Hospitalar do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Braga

****Assistente Hospitalar Graduado do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Coordenadora da Unidade de Diagnóstico Pré Natal e Medicina Materno-Fetal, Hospital de Braga

*****Diretor do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Braga

DHPN incluem anticorpos direcionados aos grupos sanguíneos ABO, Kell (K and k), Duffy (Fya), Kidd (Jka and Jkb) e MNSs (M, N, S, and s)¹²⁻¹³.

Numa mulher RhD negativa, o contacto com eritrócitos que à superfície expressam o antígeno D, desencadeia uma resposta imune primária com produção de anticorpos anti-D do tipo Imunoglobulina M (IgM), incapazes de atravessar a placenta¹. Progressivamente, os anticorpos IgM são substituídos por anticorpos do tipo Imunoglobulina G (IgG), que atravessam a placenta e podem provocar DHPN¹. A resposta secundária desencadeia-se rapidamente após uma nova exposição, mesmo que mínima, ao antígeno^{14,15}. O facto do primeiro contacto desenvolver uma resposta imune primária faz com que, geralmente, numa primeira gravidez sem intercorrências não se desenvolva a doença, embora cerca de 2% das grávidas RhD negativas, nestas circunstâncias, irá desenvolver sensibilização para o RhD antes do parto, e cerca de 16% vão fazê-lo durante o parto, na ausência de profilaxia⁹. Uma vez que uma mulher se torna RhD isoimmunizada, todas as gravidezes subsequentes de feto RhD positivo serão afetadas¹⁶.

Em Portugal, a prevalência de grávidas RhD negativas ronda os 15%⁹. Uma prevalência semelhante (16%) é estimada para a população caucasiana onde cerca de 10% de todas as gravidezes envolvem uma mãe com grupo sanguíneo RhD negativo e um feto RhD positivo, colocando a mãe em risco de isoimmunização e o feto em risco de desenvolver DHPN¹⁷.

Na década de 60, a introdução da profilaxia antenatal da isoimmunização RhD com imunoglobulina anti-D pós-parto permitiu reduzir a prevalência da DHPN de 16% para aproximadamente 2%^{2,17,18}. Nos anos 70 foi implementada a profilaxia antenatal com administração de imunoglobulina anti-D no início do terceiro trimestre, reduzindo a prevalência da DHPN para um valor de 0,2-0,3%^{19,20}. Em Portugal, à semelhança de outros países, está protocolada a administração de imunoglobulina anti-D à 28ª semana de gestação a todas as grávidas RhD negativas não isoimmunizadas e até 72 horas após o parto, no caso de o RN ser RhD positivo⁹. As indicações obstétricas adicionais para a administração da imunoglobulina anti-D encontram-se descritas no Quadro I⁹.

Não obstante a eficácia inequívoca da imunoglobulina anti-D, algumas isoimmunizações podem passar despercebidas pelo não reconhecimento de eventos sensibilizantes ao longo da gravidez, nomeadamente episódios de hemorragia fetomaternal clinicamente si-

QUADRO I. INDICAÇÕES OBSTÉTRICAS PARA REALIZAÇÃO DA PROFILAXIA ANTI-D

1. Pós-parto com recém-nascido do grupo RhD positivo, idealmente antes das 72 horas;

2. Abortos:

- 2.1 Interrupção médica da gravidez por métodos cirúrgicos ou médicos, independentemente da idade gestacional;
- 2.2 Aborto espontâneo completo ou qualquer tipo de aborto necessitando de curetagem uterina, após as 6 semanas de gestação*;
- 2.3 Gravidez ectópica ou gravidez molar*;
- 2.4 Ameaça de aborto com metrorragia:
 - 2.4.1 Após as 12 semanas
 - 2.4.2 No caso de metrorragia intermitente, repetir anti-D de 6-6 semanas

3. Hemorragia da 2ª metade da gravidez (descolamento da placenta, placenta prévia);

4. Técnicas invasivas de diagnóstico/terapêutica fetal:

- 4.1 Amniocentese
- 4.2 Cordocentese
- 4.3 Biópsia das vilosidades
- 4.4 Inserção de drenos
- 4.5 Redução embrionária

5. Cirurgia/trauma abdominal (inclui a versão externa)

6. Morte fetal

Quando a imunoglobulina foi administrada após amniocentese ou por metrorragia, por exemplo, a profilaxia deve ser repetida 12 semanas após a primeira administração.

* Nestas situações poderá ser administrada uma dose, inferior a 300 µg, se essas apresentações estiverem disponíveis.

lenciosos^{1,21-23}. Adicionalmente, os derivados de plasma de doadores são produtos cada vez mais escassos e dispendiosos para o Sistema Nacional de Saúde, acarretando risco de transmissão de doenças infecciosas, bem como de reações anafiláticas pós transfusionais^{5,9,24}.

Em mulheres grávidas, além dos fragmentos de DNA maternos, existem em circulação sequências de DNA com menos de 300 pares de bases pertencentes ao feto^{25,26}. A percentagem de DNA fetal livre na circulação materna parece variar entre 5 e 10% da totalidade de DNA livre^{27,28}. A sua concentração diminui rapidamente minutos após a dequitação e desaparece na totalidade até duas semanas pós-parto sendo, por isso, um bom substrato para o Diagnóstico Pré-Natal (DPN) não invasivo, contrariamente às células fetais que podem persistir durante anos na circulação materna²⁹⁻³¹.

A técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real permite amplificar sequências do gene RhD em grávidas RhD negativas, com sensibilidades de 94%-99,5% e especificidades de 99,5%-99,8%³³. A introdução de controlos internos que asseguram a presença de DNA fetal na amostra estudada (gene SRY-Sex Determining Region Y, no caso de fetos do sexo masculino, ou o RASSF1A, que se encontra hipermetilado no DNA fetal), assegura a quase inexistência de falsos negativos e suas consequências clínicas (isoimunização RhD e DHPN futura)^{34,35}.

Na Europa, em aproximadamente 40% das grávidas RhD negativas, está a ser administrada imunoglobulina anti-D desnecessariamente, por se tratarem de gravidezes de fetos RhD negativos^{16,31,32}. A inclusão da genotipagem RhD fetal não invasiva no seguimento das grávidas RhD negativas permite uma racionalização na administração da imunoglobulina anti-D, reservando-a para os casos em que o feto apresente grupo sanguíneo RhD positivo^{31,36}. Recentemente, na Dinamarca e Holanda foi implementada esta técnica no acompanhamento de rotina das grávidas RhD negativas não isoimunizadas^{11,18,36} e vários autores recomendam a implementação da técnica sugerindo que, inclusivamente, poderá haver uma diminuição dos custos^{5,6,17,37,38}.

Dadas as vantagens da inclusão da genotipagem não invasiva do grupo sanguíneo RhD fetal no seguimento de rotina de grávidas RhD negativas não isoimunizadas surge a necessidade de avaliar o impacto económico associado à aplicação da técnica numa amostra da população portuguesa.

O objetivo principal do presente estudo consistiu na avaliação do impacto económico da genotipagem RhD fetal não invasiva, a partir do sangue materno, no seguimento de rotina de grávidas com grupo sanguíneo RhD negativo, não isoimunizadas, vigiadas no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital em questão, comparativamente à administração de imunoglobulina anti-D a todas as grávidas RhD negativas, não isoimunizadas, nas situações previstas na Circular normativa número 2 – Profilaxia da isoimunização Rh, 15/01/2007 da Direção-Geral da Saúde⁹. Concomitantemente foi efetuada a análise da prevalência de grávidas RhD negativas e de RN RhD negativos e positivos, filhos de mulheres RhD negativas, na população em estudo. Foi igualmente determinada a percentagem de grávidas RhD negativas, na população em estudo, com indicação para administração de imunoglobulina anti-D durante a gravidez, além da preconiza-

da à 28ª semana de gestação, bem como as indicações obstétricas subjacentes à sua prescrição.

MÉTODOS

O presente trabalho de investigação foi submetido e aprovado pelo Comité de ética do Hospital em questão e pela Subcomissão de ética para as Ciências da Vida e da Saúde, tendo-se procedido a um estudo observacional, transversal, retrospectivo e analítico.

Foram avaliadas as grávidas que realizaram ecografia na Unidade de Medicina Fetal e Diagnóstico Pré-Natal (UMFDPN) do Hospital em questão, com registos no programa Astraia® no período compreendido entre 01/01/2007 a 31/12/2012. Para determinar a prevalência de grávidas RhD negativas foram avaliadas apenas as primeiras gravidezes de cada mulher que ocorreram no período mencionado. Para avaliar o impacto económico da implementação da genotipagem do RhD fetal não invasiva e analisar a prevalência dos grupos sanguíneos RhD nos RN, foram contabilizadas todas as gravidezes das mulheres Rh negativas incluídas no estudo, que tivessem ocorrido no período compreendido entre 01/01/2007 a 31/12/2012.

Considerando a gravidez como unidade de observação, foram consultados os processos de cada uma das grávidas e seus RN, com recurso ao programa informático Glintt – Soluções Clínicas® procedendo-se à exclusão de grávidas isoimunizadas (com Teste de Coombs Indireto - TCI positivo previamente à administração de Imunoglobulina anti-D), de gravidezes múltiplas ou não evolutivas e ainda de gravidezes cujo fator RhD do recém-nascido era desconhecido.

Relativamente às grávidas, procedeu-se à recolha da data de nascimento, grupo sanguíneo ABO e Rh e resultado do TCI, procedimentos invasivos realizados, episódios de hemorragia obstétrica e de trauma abdominal ocorridos durante a gravidez e administração de imunoglobulina anti-D durante a gravidez e no pós parto. No que concerne aos RN, recolheu-se informação relativa à data de nascimento, sexo, grupo sanguíneo ABO e Rh e resultado do Teste de Coombs Direto (TCD). Sempre que disponível, foi registado o grupo sanguíneo ABO e Rh paterno.

Os dados recolhidos foram organizados numa base de dados Excel, Microsoft Office Professional Plus 2010® e trabalhados estatisticamente com recurso ao *software Statistical Package for the Social Sciences*®

QUADRO II. VALOR MONETÁRIO DOS PROCEDIMENTOS

	Preço (€)
TCI*	3,26
Ig anti-D**	75,50
Genotipagem RhD fetal não invasiva*	96,10

*Consta na tabela de preços das Instituições e Serviços integrados no Serviço Nacional de Saúde – Diário da República.

**Preço estabelecido pelo laboratório CSL Behring, fornecedor do Hospital em questão.

(SPSS) versão 22.0. Foi aplicado o Teste Exato de Fisher para estabelecer relações entre as variáveis, tendo sido considerada significância estatística para $p < 0.05$.

Para a análise económica da aplicação da genotipagem do RhD fetal não invasiva a todas as grávidas RhD negativas não isoimunizadas e administração de imunoglobulina anti-D seletiva, comparativamente à pro-

filaxia sistemática da isoimunização RhD ao mesmo grupo de grávidas, foram considerados o grupo A (aplicação do procedimento atual com administração de imunoglobulina anti-D a todas as grávidas RhD negativas) e grupo B (aplicação da genotipagem fetal e administração de imunoglobulina anti-D seletiva).

O valor monetário associado a cada procedimento incluído no cálculo económico encontra-se descrito no Quadro II.

RESULTADOS

Do conjunto de grávidas incluídas na população em estudo ($n=9272$), 16,7% ($n=1545$) são do grupo sanguíneo RhD negativo, correspondendo a 1758 gravidezes das quais se excluíram 326 (18,5%) perfazendo um total de 1432 gravidezes (Figura 1).

Relativamente aos 1432 RN observou-se que 49,2% era do sexo feminino e 50,8% era do sexo masculino;

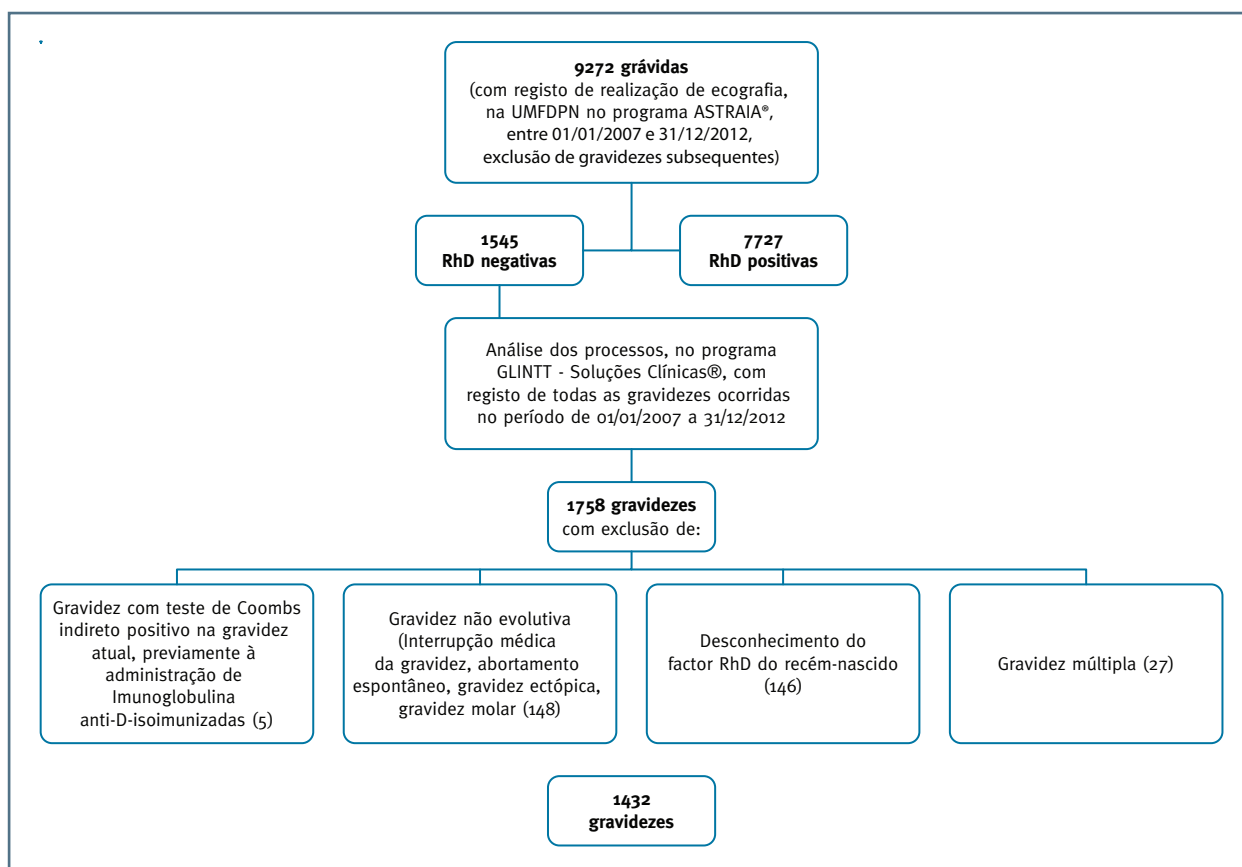


FIGURA 1. Seleção da população em estudo

59,6% eram RhD positivos ($n=853$) e 3,9% ($n=56$) apresentaram TCD positivo, dos quais 18,8% ($n=10$) eram RN RhD negativos e 81,2% ($n=46$) eram RhD positivos (Quadro III). Destes últimos, 56,5% ($n=26$) apresentavam TCD com grau de positividade ≥ 6 .

O grupo sanguíneo RhD paterno foi conhecido em apenas em 3% das gravidezes tendo-se verificado uma distribuição equitativa (cerca de 50%) de pais RhD positivos e negativos. Nos casos em que o RhD paterno foi positivo ($n=21$), constatou-se que 10 dos RN apresentaram RhD negativo (52,4%), e 11 RN (47,6%) apresentaram RhD positivo.

QUADRO III. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE GRAVIDEZES DE MULHERES RH NEGATIVAS

	Frequência absoluta (n)	Frequência Relativa (%)
Recém-Nascidos (n=1432)		
Género		
Feminino	705	49,2
Masculino	727	50,8
RhD		
Negativo	579	40,4
Positivo	853	59,6
ABO		
A	685	47,8
B	124	8,7
O	566	39,5
AB	57	4
TCD		
Negativo	1376	96,1
Positivo	56	3,9
Gravidezes (n=1432)		
Trauma Abdominal		
Sim	4	0,3
Não	1428	99,7
Hemorragia		
Sim	71	5
Não	1361	95
Técnicas invasivas de DPN		
Sim	36	2,5
Não	1396	97,5
Progenitores sexo masculino (n=1432)		
RhD		
Conhecido	42	3
Desconhecido	1390	97

Constatou-se que os eventos obstétricos antenatais com indicação para administração de imunoglobulina anti-D, além da preconizada à 28ª semana de gestação e ao nascimento, incluíram episódios hemorrágicos, trauma abdominal ou realização de amniocentese. Conjuntamente, ocorreram em 7,8% ($n=111$) das grávidas RhD negativas (Quadro III). Destas grávidas, apenas 73 apresentaram indicação formal para administração de imunoglobulina anti-D extra, das quais 49,3% ($n=36$) tinham fetos RhD negativos e 50,7% ($n=37$) tinha fetos RhD positivos. Em 5% das gravidezes verificou-se episódio de hemorragia (Quadro III), com maior prevalência no primeiro trimestre, existindo uma gravidez na qual não foi possível identificar o trimestre no qual ocorreu a hemorragia (Figura 2). Destas gravidezes, a percentagem de RN RhD negativos e positivos foi de 47,9% ($n=34$) e 52,1% ($n=37$), respetivamente. Foi necessária a realização de técnicas invasivas de DPN no 2º trimestre da gravidez em 2,5% ($n=36$) das grávidas RhD negativas (Quadro III), com uma percentagem de fetos RhD negativos de 41,7% ($n=15$).

Utilizando o teste Exato de Fisher, foi analisada a relação entre resultado do TCD dos RN e a ocorrência de hemorragia ou realização de amniocentese durante a gravidez. Os episódios de hemorragia obstétrica não se associaram a mais TCD positivos nos RN ($p=1$) (Quadro IV). No entanto, das mulheres que realizaram amniocentese, 19% tiveram RN com TCD positivo, ao passo que, entre a população de grávidas que não necessitou de exame invasivo, apenas 5% tiveram RN com TCD positivo e esta associação foi estatisticamente significativa, $p=0,023$ (Quadro IV).

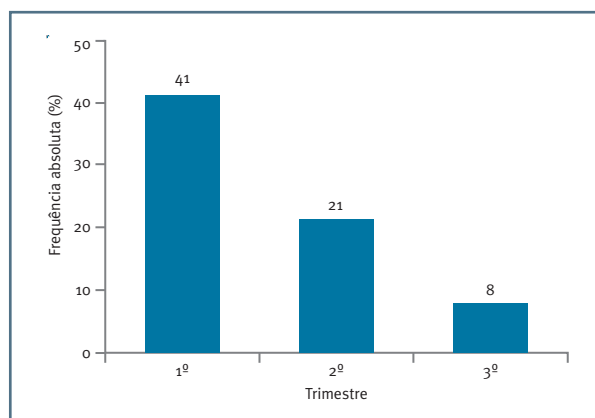


FIGURA 2. Frequência dos episódios de hemorragia obstétrica por trimestre

QUADRO IV. RELAÇÃO DAS VARIÁVEIS COM O TCD

	Teste de Coombs Direto		Total	p-value
	Negativo N (%)	Positivo N (%)		
Hemorragia				
Sim	35 (94,6)	2 (5,4)	37 (100)	p = 1f
Não	772 (94,6)	44 (5,4)	816 (100)	
Amniocentese				
Sim	17 (81)	4 (19)	21 (100)	p <0,023f
Não	790 (95)	42 (5)	832 (100)	

f Teste Exato de Fisher

ANÁLISE ECONÓMICA

No que concerne à análise económica do grupo A, referente à profilaxia sistemática da isoimunização RhD, atualmente recomendada pela Direção-Geral da Saúde, foram considerados os custos monetários associados à realização de dois TCD durante a gravidez, a todas as 1432 grávidas RhD negativas, no primeiro trimestre e previamente à administração da imunoglobulina anti-D [nRh(D) × (2×Ctci)], bem como o custo da administração de 1432 imunoglobulinas anti-D pelas 28 semanas de gestação [nRh(D) × CuIg]. Das 111 (7,8%) grávidas RhD negativas com episódios de hemorragia obstétrica, trauma abdominal ou realização de técnicas invasivas durante a gravidez (Quadro III), apenas 73 apresentaram indicação formal para administração de Imunoglobulina anti-D, além da preconizada à 28ª semana de gestação e após o nascimento. Desta forma, foi considerado o custo associado a 73 imunoglobulinas anti-D extra [nIgE × CuIg]. Finalmente, foram ainda contabilizadas 853 imunoglobulinas anti-D administradas aos 59,6% de puérperas com RN RhD positivos [nRNP × CuIg]. Assim, o encargo económico total imputado à concretização da profilaxia sistemática da isoimunização RhD foi de 187 367 euros ou cerca de 131 euros por gravidez (Quadro V).

Relativamente à análise económica do grupo B, relativa à genotipagem não invasiva do grupo RhD fetal e posterior administração seletiva de imunoglobulina anti-D, foi considerado o custo associado à genotipagem RhD fetal não invasiva e realização do TCI no primeiro trimestre das 1432 grávidas RhD negativas [nRh(D) × Cgen e nRh(D) × Ctci, respetivamente]. Das 1432 grávidas RhD negativas, 59,6% (n=853) tinham fetos RhD positivos. Assim, foi considerado o

custo inerente à administração de duas imunoglobulinas Anti-D (respetivamente às 28 semanas de gestação e após o parto) e realização do TCI, previamente à administração da imunoglobulina anti-D, a estas grávidas [nRNP × (2 × CuIg + Ctci)]. Por fim, das 73 grávidas que apresentaram indicação formal administração de Ig, além da preconizada à 28ª semana de gestação e ao nascimento, apenas 37 tinham fetos RhD positivos, pelo que foi adicionado o custo de 37 imunoglobulinas anti-D extra [nIgE × CuIg]. Deste modo, o custo total associado à genotipagem não invasiva do grupo RhD fetal e posterior administração seletiva de imunoglobulina anti-D na população em estudo seria de 276 661 euros ou 193 euros por gravidez (Quadro V).

QUADRO V. ANÁLISE ECONÓMICA

	Custo (€)
Grupo A – Procedimento atual	
imunoprofilaxia	
nRh(D) × (2×Ctci)	9 337
nRh(D) × CuIg	108 116
nRNP × CuIg	64 402
nIgE × CuIg	5 512
Total	187 367
Custo médio por gravidez	131
Grupo B – Genotipagem e Ig seletiva	
nRh(D) × Cgen	137 615
nRh(D) × Ctci	4 668
nRNP × (2 × CuIg + Ctci)	131 584
nIgE × CuIg	2 794
Total	276 661
Custo médio por gravidez	193

Assim, para a população em análise, a genotipagem não invasiva do grupo RhD fetal, a partir do plasma materno, ficaria 62 euros mais onerosa por gravidez e na globalidade com um encargo financeiro 89 294 euros superior, comparativamente à prática corrente de profilaxia sistemática da isoimunização RhD.

DISCUSSÃO

A introdução da profilaxia antenatal da isoimunização RhD com imunoglobulina anti-D permitiu reduzir substancialmente a prevalência da DHPN². Recentemente, a descoberta da presença de DNA fetal livre na circulação materna permitiu a oportunidade de realização de DPN não invasivo, nomeadamente a genotipagem RhD fetal³. O principal objetivo deste estudo foi a avaliação do impacto económico da aplicação desta técnica a uma população de grávidas RhD negativas não isoimunizadas.

A prevalência de 16,7% de grávidas RhD negativas encontrada no presente estudo é semelhante à descrita na literatura, sendo a prevalência em caucasianos estimada em 16% e, em Portugal, cerca de 15%^{9,17}. Concomitantemente, a percentagem de RN RhD negativos encontrada (40,4%) vai de encontro ao descrito na população europeia¹⁶.

Registaram-se na população em estudo 73 eventos obstétricos com indicação para administração adicional de imunoglobulina anti-D, que incluíram episódios hemorrágicos, trauma abdominal ou realização de amniocentese. Destas gravidezes, 49,3% (n=36) eram de fetos RhD negativos e, portanto, a realização de imunoprofilaxia seria desnecessária. Uma vez que os procedimentos invasivos ou episódios de hemorragia durante a gravidez aumentam a probabilidade de isoimunização, foi avaliada a relação entre a sua ocorrência e o resultado do TCD nos RN RhD positivos. A realização de amniocentese associou-se, de forma estatisticamente significativa, a um maior número de TCD positivos comparativamente ao grupo que não realizou procedimentos invasivos. Por nem sempre ter sido registado no processo informático a administração de imunoglobulina anti-D pós procedimento, não foi possível concluir se este achado se deveu à incorreta aplicação da profilaxia da isoimunização Rh. No entanto, mesmo perante a correta administração da imunoglobulina anti-D, a realização de um teste invasivo pode aumentar o risco de isoimunização.

Em Portugal, existe um consentimento informado

que deve ser disponibilizado à grávida aquando a administração da imunoglobulina anti-D, onde está descrita a ausência de indicação de administração de imunoglobulina anti-D quando o progenitor é RhD negativo. No presente estudo, apenas em 3% das gravidezes foi possível ter acesso ao grupo sanguíneo RhD do progenitor. Deste modo, dado o desconhecimento da percentagem real de progenitores RhD negativos na população em estudo, em cuja gravidez não estaria indicada a profilaxia com imunoglobulina anti-D, os custos económicos estimados para ambos os grupos foram certamente sobrestimados.

No que concerne à avaliação do impacto económico, dada a ausência de informação em alguns processos clínicos acerca da realização ou não de imunoprofilaxia, assumiu-se que a imunoglobulina anti-D foi corretamente prescrita e administrada. Contrariamente a outros estudos que demonstraram um custo benefício efetivo na aplicação da genotipagem RhD fetal não invasiva no seguimento de grávidas não sensibilizadas^{18,37,38}, o presente estudo concluiu que esta técnica parece ser mais onerosa, relativamente à profilaxia anti-D sistemática, com um custo total de 276 661 euros e de 193 euros por gravidez, representando um encargo financeiro adicional total de 89 294 euros ou de 62 euros por gravidez, comparativamente à prática atual de profilaxia sistemática da isoimunização RhD a grávidas RhD negativas. O presente estudo constitui um dos primeiros estudos nacionais a avaliar o impacto económico da implementação da aplicação da genotipagem RhD fetal não invasiva na profilaxia da isoimunização RhD, representando uma mais-valia por atender à prevalência real do grupo sanguíneo RhD das grávidas e respetivos RN da população em estudo, bem como à presença de situações obstétricas com indicação para administração adicional de imunoglobulina anti-D. Um estudo semelhante desenvolvido em Portugal, em 2009, demonstrou que a genotipagem RhD fetal não invasiva teria um acréscimo nos custos⁴⁰. Porém, este estudo não incluiu o custo da administração de imunoglobulina anti-D associada à presença de indicações obstétricas adicionais. Concomitantemente, não foi determinada a prevalência de RN RhD negativos de mães RhD negativas, tendo sido utilizadas percentagens descritas na literatura. Apesar dos resultados obtidos, temos que considerar que, com a aplicação mais generalizada da genotipagem não invasiva, é expectável a diminuição do seu preço e que, devido à alta especificidade e sensibilidade da técnica, a tipagem do grupo sanguíneo RhD fetal após o nas-

cimento passe a ser desnecessária, diminuindo o encargo financeiro associado. Adicionalmente, não foram contabilizados neste estudo os custos indiretos associados ao absentismo laboral e consultas adicionais necessárias na profilaxia anti-D sistemática, que seriam dispensáveis nos casos de gravidezes com fetos RhD negativos, se se soubesse antecipadamente o grupo sanguíneo RhD fetal. De facto, vários estudos realçam as vantagens da aplicação da genotipagem RhD fetal não invasiva, nomeadamente na presença de indicações obstétricas adicionais ao 3º trimestre e pós parto^{36,44,45}. Tiblad *et al.* realizaram um estudo recente na Suécia onde estimaram a incidência da isoimunização RhD após implementação da genotipagem não invasiva em grávidas RhD negativas e providenciando imunoprofilaxia anti-D às grávidas de RN RhD positivos. Concluíram que houve uma redução significativa da incidência de isoimunização comparável à obtida com a correta implementação da imunoprofilaxia a todas as grávidas RhD negativas¹⁶. A Dinamarca e Holanda implementaram a técnica como rotina no acompanhamento das grávidas RhD negativas não isoimunizadas; contudo, após implementação, ainda não realizaram nenhum estudo sobre a efetividade na redução da incidência dos novos casos de isoimunização¹⁸. Adicionalmente, a introdução da genotipagem não invasiva permitirá reduzir a exposição de cerca de 40% das grávidas RhD negativas ao risco biológico da administração de derivados humanos, por transmissão de agentes infecciosos ainda desconhecidos ou que resistam aos métodos de preparação, e a reações anafiláticas que, embora raras, se encontram descritas na literatura^{5,9,24}. Por outro lado, como todos os hemoderivados, a imunoglobulina anti-D é, cada vez mais, um produto escasso.

Relativamente às limitações deste estudo, destaca-se o viés relacionado com a informação, por vezes deficitária, contida nos processos clínicos consultados que, além de não ter permitido uma análise económica baseada nas prescrições reais de imunoglobulina anti-D pode, igualmente, ter levado a uma subestimação de eventos obstétricos com indicação para imunoprofilaxia. Assim, mais relevante do que fazer uma avaliação com base nas normas de orientação em vigor, será fazer uma avaliação da forma como são implementadas. Simultaneamente, o conhecimento do grupo sanguíneo RhD dos progenitores teria permitido uma análise económica mais realista.

Em conclusão, no que concerne ao objetivo principal do estudo, do ponto de vista meramente económi-

co, a imunoprofilaxia anti-D sistemática continua a apresentar-se vantajosa em detrimento da aplicação da genotipagem RhD fetal como procedimento *standard* no acompanhamento de rotina de grávidas RhD negativas não sensibilizadas. Os custos imputados à técnica de genotipagem são irrefutavelmente maiores, no entanto, os benefícios intangíveis inerentes à mesma são importantes e merecedores de atenção.

NOTA

As duas primeiras autoras contribuíram de igual forma para a concretização do artigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Urbaniak SJ, Greiss MA. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev.* 2000;14(1):44-61.
2. Liumbruno GM, D'Alessandro A, Rea F, et al. The role of antenatal immunoprophylaxis in the prevention of maternal-foetal anti-Rh(D) alloimmunisation. *Blood transfusion.* 2010;8(1):8-16.
3. Maddocks DG, Alberry MS, Attilakos G, et al. The SAFE project: towards non-invasive prenatal diagnosis. *Biochemical Society transactions.* 2009;37(Pt 2):460-465.
4. Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion.* 2008;48(2):373-381.
5. Illanes S, Soothill P. Management of red cell alloimmunisation in pregnancy: the non-invasive monitoring of the disease. *Prenatal diagnosis.* 2010;30(7):668-673.
6. Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, et al. Reliable test for prenatal prediction of fetal RhD type using maternal plasma from RhD negative women. *Prenatal diagnosis.* 2005;25(11):1040-1044.
7. Bowman JM, Pollock JM, Penston LE. Fetomaternal transplacental hemorrhage during pregnancy and after delivery. *Vox sanguinis.* 1986;51(2):117-121.
8. Vicente L, Pinto G, Serrano F, Soares C, Alegria A. Profilaxia da isoimunização RhD: uma proposta de protocolo. *Acta Médica Portuguesa.* 2003;16(4):255-260.
9. Direção Geral da Saúde. Profilaxia da Isoimunização Rh. Circular normativa nº 2/DSMIA de 15/01/07.
10. Chown B. On a search for rhesus antibodies in very young foetuses. *Archives of disease in childhood.* 1955;30(151):232-233.
11. Dovc-Drnovsek T, Klemenc P, Toplak N, Blejec T, Briel I, Rozman P. Reliable Determination of Fetal RhD Status by RHD Genotyping from Maternal Plasma. *Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie.* 2013;40(1):37-43.
12. Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Chapter 4, Hemolytic disease of the newborn.
13. van der Schoot CE, Tax GH, Rijnders RJ, de Haas M, Christiaens GC. Prenatal typing of Rh and Kell blood group system antigens: the edge of a watershed. *Transfusion medicine reviews.* 2003;17(1):31-44.
14. Oliveira J, Osório N., Rocha J, Cruz B, Figueiredo J, Caseiro A, et al. Fetal RHD an RHCE Genotyping in Plasma of Rh Negative Pregnant Women. *International Journal of Biomedical Laboratory Science.* 2012;1(2):50-58.

15. Bowman JM. Antenatal suppression of Rh alloimmunization. *Clinical obstetrics and gynecology*. 1991;34(2):296-303.
16. Tiblad E, Taune Wikman A, Ajne G, et al. Targeted routine antenatal anti-D prophylaxis in the prevention of RhD immunisation—outcome of a new antenatal screening and prevention program. *PloS one*. 2013;8(8):e70984.
17. Szczepura A, Osipenko L, Freeman K. A new fetal RHD genotyping test: costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. *BMC pregnancy and childbirth*. 2011;11:5.
18. Clausen FB, Christiansen M, Steffensen R, et al. Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in D- pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion*. 2012;52(4):752-758.
19. Koelewijn JM, de Haas M, Vrijkotte TG, Bonsel GJ, van der Schoot CE. One single dose of 200 microg of antenatal RhIG halves the risk of anti-D immunization and hemolytic disease of the fetus and newborn in the next pregnancy. *Transfusion*. 2008;48(8):1721-1729.
20. Turner RM, Lloyd-Jones M, Anumba DO, et al. Routine antenatal anti-D prophylaxis in women who are Rh(D) negative: meta-analyses adjusted for differences in study design and quality. *PloS one*. 2012;7(2):e30711.
21. Hughes RG, Craig JL, Murphy WG, Greer IA. Causes and clinical consequences of Rhesus (D) haemolytic disease of the newborn: a study of a Scottish population, 1985-1990. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1994;101(4):297-300.
22. Urbaniak SJ. The scientific basis of antenatal prophylaxis. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1998;105 Suppl 18:11-18.
23. McSweeney E, Kirkham J, Vinall P, Flanagan P. An audit of anti-D sensitisation in Yorkshire. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1998;105(10):1091-1094.
24. Rafi I, Chitty L. Cell-free fetal DNA and non-invasive prenatal diagnosis. *The British journal of general practice: the journal of the Royal College of General Practitioners*. 2009;59(562):e146-148.
25. Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA*. 2005;293(7):843-849.
26. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clinical chemistry*. 2010;56(8):1279-1286.
27. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *American journal of human genetics*. 1998;62(4):768-775.
28. Lun FM, Chiu RW, Allen Chan KC, Yeung Leung T, Kin Lau T, Dennis Lo YM. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2008;54(10):1664-1672.
29. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *British journal of haematology*. 1999;105(3):574-583.
30. Hui L, Vaughan JI, Nelson M. Effect of labor on postpartum clearance of cell-free fetal DNA from the maternal circulation. *Prenatal diagnosis*. 2008;28(4):304-308.
31. Schmidt L.C., Lobato MM, Corrêa Júnior MD, AVC C. Non invasive Fetal RhD Genotyping in management of pregnant RhD negative women. *Femina*. 2011;39(7).
32. Kolialexi A, Tounta G, Mavrou A. Noninvasive fetal RhD genotyping from maternal blood. *Expert review of molecular diagnostics*. 2010;10(3):285-296.
33. Legler TJ, Muller SP, Haverkamp A, Grill S, Hahn S. Prenatal RhD Testing: A Review of Studies Published from 2006 to 2008. *Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. 2009;36(3):189-198.
34. Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2011;16(2):88-93.
35. Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of non-invasive prenatal diagnosis. *Clinical chemistry*. 2006;52(12):2211-2218.
36. Tiblad E, Westgren M, Pasupathy D, Karlsson A, Wikman AT. Consequences of being Rhesus D immunized during pregnancy and how to optimize new prevention strategies. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2013;92(9):1079-1085.
37. Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ (Clinical research ed)*. 2008;336(7648):816-818.
38. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christians LG, de Haas M. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfusion clinique et biologique: Journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2006;13(1-2):53-57.
39. Ulm B, Svoboda G, Ulm MR, Bernaschek G, Panzer S. Male fetuses are particularly affected by maternal alloimmunization to D antigen. *Transfusion*. 1999;39(2):169-173.
40. Valente, Maria Eduarda. Avaliação do impacto da determinação do grupo fetal RhD na profilaxia da aloimunização na gravidez. *Repositório Científico do Centro Hospitalar do Porto* 2009; <http://hdl.handle.net/10400.16/1389>
41. MacKenzie IZ, Findlay J, Thompson K, Roseman F. Compliance with routine antenatal rhesus D prophylaxis and the impact on sensitisations: observations over 14 years. *BJOG*. 2006;113(7):839-843.
42. Pilgrim H, Lloyd-Jones M, Rees A. Routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative women: a systematic review and economic evaluation. *Health technology assessment (Winchester, England)*. 2009;13(10):iii, ix-xi, 1-103.
43. Scott F, Chan FY. Assessment of the clinical usefulness of the 'Queenan' chart versus the 'Liley' chart in predicting severity of rhesus iso-immunization. *Prenatal diagnosis*. 1998;18(11):1143-1148.
44. Akolekar R, Finning K, Kuppusamy R, Daniels G, Nicolaides KH. Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11-13 weeks of gestation. *Fetal diagnosis and therapy*. 2011;29(4):301-306.
45. Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, Olsson ML, Westgren M, Reilly M. Noninvasive single-exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy. *Obstetrics and gynecology*. 2012;120(2 Pt 1):227-234.